昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, November 2010, 53(11): 1295 - 1304 ISSN 0454 - 6296

菜粉蝶线粒体基因组的全序列测定和分析

毛增辉[1,2]，郝家胜[1,*]，朱国萍[1]，胡 静[1]，司曼曼[1]，朱朝东[3,*]

(1. 安徽师范大学生命科学学院分子进化与生物多样性研究室，安徽芜湖 241000；2. 安徽师范大学附属中学，安徽芜湖 241000；3. 中国科学院动物研究所动物进化与系统学院级重点实验室，北京 100080)

摘要：目前关于蝶类线粒体基因组全序列及其分子进化的研究还不多见。本研究通过长 PCR 和引物步移法对菜粉蝶 *Pieris rapae* Linnaeus 线粒体基因组全序列进行了测定和初步分析。结果表明：菜粉蝶线粒体基因组全长 15 157 bp，包含 13 个蛋白编码基因、22 个 tRNA 和 2 个 rRNA 基因以及 1 个非编码的控制区域，它们的长度分别是 11 196 bp，1 474 bp，2 093 bp 和 393 bp。37 个基因的位置与已报道的其他蝶类基本一致，共有 10 对基因间存在总共 59 bp 的重叠，重叠碱基数在 1～35 bp 之间；基因间隔序列共计 13 处 120 bp，间隔长度 1～46 bp 不等，最大的基因间隔 46 bp，位于 $tRNA^{Ile}$ 和 $tRNA^{Gln}$ 基因之间。另外，基于 13 个蛋白质编码基因的氨基酸序列，重建了基于蛋白质编码基因序列数据的 11 种代表性蝶类的 NJ 和 MP 系统树。结果表明：凤蝶类(包括凤蝶和绢蝶)为一大支系，粉蝶类、灰蝶类与蛱蝶类(包括蛱蝶、珍蝶)构成另一大支系。结果不支持粉蝶科与凤蝶科(包括凤蝶类和绢蝶类)构成单系群，却显示粉蝶科、灰蝶科和蛱蝶科的组合为单系群。

关键词：鳞翅目；粉蝶科；菜粉蝶；线粒体基因组；RNA 二级结构；重复序列

中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2010)11-1295-10

Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Pieris rapae* Linnaeus (Lepidoptera: Pieridae)

MAO Zeng-Hui[1,2], HAO Jia-Sheng[1,*], ZHU Guo-Ping[1], Hu Jing[1], SI Man-Man[1], ZHU Chao-Dong[3,*] (1. Laboratory of Molecular Evolution and Biodiversity, College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu, Anhui 241000, China; 2. The High School Affiliated to Anhui Normal University, Wuhu, Anhui 241000, China; 3. Key Laboratory of Zoological Systematics and Evolution, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Up to now, the higher level taxonomic and phylogenetic studies about the butterflies are still limited and remain many controversial issues. In this study, the complete mitochondrial genome of *Pieris rapae* Linnaeus was sequenced by using long-PCR and conserved primer walking techniques, aiming at supporting more mitogenomic data to further clarify these problems. The results of genome characterization analysis showed that the mitogenome is 15 157 bp in size, containing 13 protein-coding genes, 22 transfer RNA genes, 2 ribosomal RNA, and an A + T-rich region, with the length of 11 196 bp, 1 474 bp, 2 093 bp and 393 bp, respectively; all the 37 genes are arranged in the same orientations as those of other butterflies determined; there are 10 overlapping sequences totalling 59 bp (1 - 35 bp for each sequence) and 13 intergenic spacer sequences totalling 120 bp (1 - 46 bp for each sequence), scattered throughout the genome, respectively, and the largest (46 bp) spacer region is located between the $tRNA^{Ile}$ and $tRNA^{Gln}$ genes. The neighbor-joining (NJ) and the maximum parsimony (MP) phylogenetic trees of the eleven representative butterfly species were reconstructed based on the complete 13 protein coding gene sequence data, and the results showed that Papilionidae (including papilionids and parnassiids) is a monophyletic group, and Pieridae is closely related with Lycaenidae and Nymphalidae (including nymphalids and acraeids in this study).

Key words: Lepidoptera; Pieridae; *Pieris rapae*; mitochondrial genome; RNA secondary structure; tandemly repeated sequences

基金项目：安徽省优秀青年科技基金(08040106811)；安徽省"重要生物资源保护与利用"重点实验室及中青年学术与技术带头人专项基金(590620)；中国科学院动物研究所动物进化与系统学院级重点实验室开放课题(O529YX5105)；国家自然科学基金委员会特殊学科点项目(J093004)；安徽省高校生物环境与生态安全省级重点实验室专项基金

作者简介：毛增辉，男，1982 年 1 月生，硕士研究生，主要从事分子系统学研究，E-mail：maoxiaosong@sohu.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：jshaonigpas@sina.com；zhucd@ioz.ac.cn

收稿日期 Received：2010-05-06；接受日期 Accepted：2010-09-16

线粒体是真核细胞内的一种十分重要的细胞器，是细胞进行氧化磷酸化的场所。动物线粒体基因组为双链闭合环状分子，少数也有线性的(Bridge *et al.*, 1992)，它们具有分子量相对较小(约为 15 ~ 19 kb)、结构简单、缺少重组、母性遗传和进化速率快等特点(Vigilan *et al.*, 1991; Stoneking and Soodyall, 1996)，已成为动物系统发育与进化、群体遗传学以及分子生态学等研究领域的理想材料。同时，随着分子生物学和生物信息学的发展，大片断序列的测定和序列分析技术已较为成熟，利用线粒体基因组序列研究系统进化关系已得到越来越多研究者的青睐并在诸多研究领域取得了许多重要的成果(Clary and Wolstenholme, 1983; Bae *et al.*, 2004; Coates *et al.*, 2005; Hajibabaei *et al.*, 2006; Mahendran *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2010)。就昆虫来说，迄今为止，已报道的线粒体基因组全序列或近乎全序列数据已近 200 条，其中，鳞翅目的序列数据已达 20 种左右。

菜粉蝶 *Pieris rapae* Linnaeus 属于蝶类中的一个广布种，同时也是粉蝶科的一个代表性种类，其幼虫(菜青虫)危害十字花科、菊科、旋花科、百合科、茄科、藜科和苋科等 9 科 35 种植物(李云瑞，2006)。目前对菜粉蝶的研究主要集中于形态学、显微技术、生态毒理、电生理研究、同工酶以及系统发生等方面(Kim *et al.*, 1988; 王见杨和黄可威，2001; 郭晓霞和郑哲民，2002; Arsene *et al.*, 2002; 侯天德等，2005; Hooks *et al.*, 2007; 翟兴礼和杨霞，2008; Jõgar *et al.*, 2009)，但其线粒体基因的研究鲜有报道(Sobti *et al.*, 2007; 许丽等，2007; 刘晓燕等，2007)，迄今尚未见到有关其线粒体基因组全序列的研究。本研究采用长 PCR 和引物步移法测定了菜粉蝶线粒体基因组的全序列，并就其结构组成进行了初步分析，以期为蝶类乃至整个昆虫类群的系统发生和分子进化研究提供新的基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用菜粉蝶标本为 2007 年采集于安徽省芜湖市汀塘公园内(东经 118.39，北纬 31.36)的新鲜标本，样品采集后立即放入 95% 的酒精中固定，带回实验室后放入冰箱中 -20℃保存(样品号：MZH07)。

1.2 基因组 DNA 的提取和纯化

采取本实验室改进的玻璃粉法提取和纯化 DNA (张大秀等，2009)。

1.3 引物设计和 PCR 合成

短 PCR 使用实验室已有的几对通用引物扩增 COI, Cytb 和 ND5 等序列，根据 PCR 所得序列和本实验室其他蝴蝶的线粒体基因组全序列，采用 Clustal X 1.8 软件(Thompson *et al.*, 1997)进行比对，选取保守性较高的区域，再利用 Primer Premier 5.0 软件设计可覆盖菜粉蝶线粒体基因组全序列的长 PCR (Long-PCR)引物(表 1)，为便于各个序列的拼接，扩增所得产物片段均有 80 ~ 300 bp 的重叠区域。所有引物皆由上海生工生物工程技术服务有限公司合成，其测序策略及引物见图 1。

表 1 文中使用的引物序列

Table 1 List of PCR and long-PCR primers used in this study

引物编号 Primer no.	上游引物序列(5′→3′) Upper primer sequence	下游引物序列(5′→3′) Lower primer sequence	退火温度(℃) Annealing temperature
COI *	GGTCA ACAAATCATAAAGATATTG	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAAT	50
COI-COII	ATGGAGCAGGAACAGGATG	TTGGGTTGTCTATTTCGTTA	49
COII *	GAGACCATTACTTGCTTTCAGTCACT	CTAATATGGCAGATTATATGTATTGG	49.8
COII-ND5	TAGAAATGGCAACTTGATC	TTAGGGTGAGATGGCTTA	49
ND5	AAAACTTCCAGAAAATAATCTC	TTGCTTTATCTACTTTAAGACA	45.5
ND5-Cytb	AATCTTAAACCTCCCATAT	GATTATTTGACCCTGTTTG	48.5
Cytb *	TATGTACTACCATGAGGACAAATAT	ATTACACCTCCTAATTTATTAGGAAT	47
Cytb-ND1	TTAGTAACCCCTGTTCACATTCA	CAGTGGCTCAAACTATTTCTTAT	51
ND1 *	CGTAAAGTCCTAGGTTATATTCAGATTCG	ATCAAAAGGAGCTCGATTAGTTTC	52
ND1-12S	TAACGCTAATCTAACTTCAT	AGTAATTGATAATCCACGA	47
12S *	AAGAGCGACGGGCGATGTGT	AAACTAGGATTAGATACCCTATTAT	59
12S-COI	TGAACTAAAATACCGCCAAAT	CATCCTGTTCCTGCTCCAT	54

* 实验室已有引物 Primers available in our laboratory.

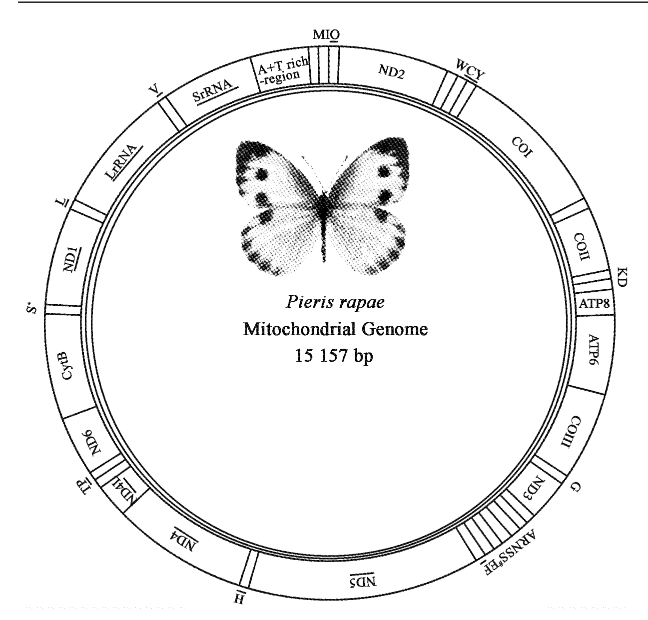


图 1　菜粉蝶线粒体 DNA 基因组遗传图谱

Fig. 1　Circular map of the mitochondrial genome of *Pieris rapae*

PCR 扩增反应体积为 50 μL：模板 DNA 100 ng，10 × Buffer 5.0 μL，$MgCl_2$（2.5 mol/L）2 μL，dNTP 1.5 μL，上下游引物（25 μmol/L）0.25 μL，1 U Taq DNA 聚合酶（5 U/μL，上海博之鑫生物技术有限公司），加纯水补足。PCR 反应的循环参数为：94℃变性 40 s，47～59℃退火 40 s，72℃延伸1 min，35 个循环，72℃延伸 10 min。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像仪扫描记录结果。

PCR 扩增产物经纯化试剂盒（V-gene DNA 凝胶回收试剂盒）纯化后，委托上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序（ABI-3730 全自动测序仪）。

1.4　序列分析和系统树构建

用 BioEdit 软件辅助，人工进行序列拼接，将测定的序列在 NCBI 上运行 BLAST 程序进行序列同源性比较，确认无误后通过 Clustal X 1.8、Chromas 1.62和 DNASTAR 软件对测出的序列进行比对分析、排列校正，人工拼接以得到完整的菜粉蝶 mtDNA 全序列。用 tRNA Scan-SE 1.21（http://lowelab.ucsc.edu/tRNA Scan-SE）定位 tRNA 基因，并用 DNASIS（Ver. 2.5，Hitachi Software Engineering）模拟特殊 tRNA 的二级结构；用 Sequin（Version 5.35）和蝶类线粒体基因组全序列进行比较定位 13 个蛋白编码基因和 2 个 rRNA 基因，并预测蛋白编码基因的氨基酸序列。用 BioEdit 软件统计序列总长、碱基百分比和 GC 含量等信息。该序列已提交 GenBank，登录号为 HM156697。

使用 MEGA 4.0 软件，采用邻接法（NJ 法）和最大简约法（MP 法），以舞毒蛾 *Lymantria dispar* 线粒体基因组（FJ617240，2009）13 个蛋白质的氨基酸组合序列为外群，选择目前 NCBI 上已上传的朝灰蝶 *Coreana raphaelis*、黑纹粉蝶 *Artogeia melete*、柑橘凤蝶 *Papilio xuthus*、中华虎凤蝶 *Luehdorfia chinensis*、台湾宽尾凤蝶 *Agehana maraho*、红珠绢蝶 *Parnassius bremeri*、苎麻珍蝶 *Acraea issoria* 和未释放的金裳凤蝶 *Troides aeacus*、斐豹蛱蝶 *Argyreus hyperbius*、大卫绢蛱蝶 *Calinaga dauidis* 和菜粉蝶 *P. rapae*（表 2）的相应序列构建系统进化树，进一步确定这 11 种代表性蝶类的系统进化关系。

2　结果与分析

2.1　菜粉蝶线粒体基因组特征

菜粉蝶线粒体基因组全长 15 157 bp，由 22 个 tRNA，2 个 rRNA，13 个蛋白编码基因和 1 个非编码的控制区组成，其结构较为紧凑，除控制区外，相邻基因之间存在基因间隔，有的相邻基因之间还有重叠现象。在整个编码区的 37 个基因中，基因间隔序列共计 13 处 120 bp，间隔长度从 1～46 bp 不等，最大的基因间隔是 46 bp，是在 $tRNA^{Ile}$ 和 $tRNA^{Gln}$ 基因之间；并发现 10 对基因间存在 59 bp 重叠，重叠碱基数在 1～35 bp 之间（表 2）。

菜粉蝶线粒体基因组中含腺嘌呤（A）6 125 bp、鸟嘌呤（G）1 180 bp、胸腺嘧啶（T）5 961 bp、胞嘧啶（C）1 891 bp，分别占全长的 40.41%，7.79%，12.48%，39.32%，A + T 含量明显高于 C + G。11 种蝶类 mtNDA 序列长度都较为稳定，都在 15.2 kb 左右，4 种碱基的百分比含量也都非常接近，碱基 A + T 含量均高于 G + C，其中菜粉蝶碱基 A 较高，为 40.41%，碱基 T 含量最低，为 39.32%。

2.2　tRNA 基因和 rRNA 基因

菜粉蝶共有 22 种 tRNA 基因，它们大多数位于蛋白编码基因之间。在 22 种 tRNA 基因中有 14 种位于重链（H 链、J 链）上，8 种位于轻链（L 链、N 链）上（Simon *et al.*，1994），碱基长度在 60～69 bp 之间，相邻 tRNA 之间存在着间隔和重叠现象。用 tRNAScan-SE 1-21 和 RNA structure 分析发现，除 $tRNA^{Ser(AGN)}$ 外，所有的 tRNA 都具有典型的三叶草结构（图 2）。16 个 tRNA 基因上共有 28 对错配，8 对在二氢尿嘧啶臂（DHU 臂）上，9 对在氨基酸臂上，

表 2 菜粉蝶线粒体基因组结构

Table 2 Characteristics of the mitochondrial genome of *Pieris rapae*

名称 Name	方向 Direction	位置 Site	长度(bp) Size	间隔 Intergenic spacer	反密码子 Anti-codon	起始密码子 Start codon	终止密码子 Stop codon
tRNA-Met	F	1 – 66	66	– 2	32 – 34 CAT	_	_
tRNA-Ile	F	65 – 128	64	1	94 – 96 GAT	_	_
tRNA-Gln	R	126 – 194	69	46	156 – 158 TTG	_	_
ND2	F	241 – 1 254	1 014	– 2	_	ATT	TAA
tRNA-Trp	F	1 253 – 1 318	66	6	1 284 – 1 286 TCA	_	_
tRNA-Cys	R	1 311 – 1 372	62	0	1 340 – 1 342 GCA	_	_
tRNA-Tyr	R	1 373 – 1 437	64	4	1 404 – 1 406 GTA	_	_
COI	F	1 442 – 2 973	1 539	0	_	TTAAAG	T + tRNA
tRNA-Leu (CUN)	F	2 974 – 3 039	66	0	3 004 – 3 006 TAA	_	_
COII	F	3 040 – 3 753	714	– 35	_	ATG	TAA
tRNA-Lys	F	3 719 – 3 789	71	– 1	3 749 – 3 751 CTT	_	_
tRNA-Asp	F	3 789 – 3 854	66	0	3 819 – 3 821 GTC	_	_
ATPase8	F	3 855 – 4 016	152	– 7	_	ATT	TAA
ATPase6	F	4 010 – 4 687	678	0	_	ATG	TAA
COIII	F	4 688 – 5 479	791	3	_	ATG	TAA
tRNA-Gly	F	5 483 – 5 547	65	0	5 513 – 5 515 TCC	_	_
ND3	F	5 548 – 5 901	354	– 2	_	ATT	TAG
tRNA-Ala	F	5 900 – 5 964	65	0	5 930 – 5 932 TGC	_	_
tRNA-Asn	F	5 965 – 6 030	66	13	5 994 – 5 996 TCG	_	_
tRNA-Ser (AGY)	F	6 043 – 6 107	65	0	6 073 – 6 075 GTT	_	_
tRNA-Ser (UCN)	F	6 108 – 6 167	60	2	6 135 – 6 137 TAA	_	_
tRNA-Glu	F	6 170 – 6 235	66	– 1	6 200 – 6 202 TTC	_	_
tRNA-Phe	R	6 235 – 6 298	64	2	6 266 – 6 268 GAA	_	_
ND5	R	6 301 – 8 025	1 724	19	_	ATT	TAG
tRNA-His	R	8 045 – 8 109	65	– 2	8 076 – 8 078 GTG	_	_
ND4	R	8 108 – 9 445	1 338	– 6	_	ATG	TAA
ND4L	R	9 439 – 9 720	282	5	_	ATG	TAA
tRNA-Thr	F	9 726 – 9 789	64	0	9 757 – 9 759 TGT	_	_
tRNA-Pro	R	9 790 – 9 855	66	1	9 820 – 9 822 TGG	_	_
ND6	F	9 857 – 10 384	528	– 1	_	ATT	TAA
Cytb	F	10 384 – 11 529	1 146	0	_	ATG	TAA
tRNA-Ser (UCN)	F	11 530 – 11 594	65	14	11 559 – 11 561 TGA	_	_
ND1	R	11 609 – 12 544	936	4	_	ATA	TAA
tRNA-Leu (UUR)	R	12 549 – 12 615	67	0	12 578 – 12 580 TAG	_	_
16S rRNA LrRNA	R	12 616 – 13 935	1 330	0	_	_	_
tRNA-Val	R	13 936 – 14 000	65	0	13 965 – 13 967 TAC	_	_
12S rRNA SrRNA	R	14 001 – 14 764	764	0	_	_	_
A + T-rich region		14 765 – 15 157	393		_	_	_

F 表示正向，R 表示反向。F and R stand for foreward and reverse direction of the mitochondrial genome, respectively.

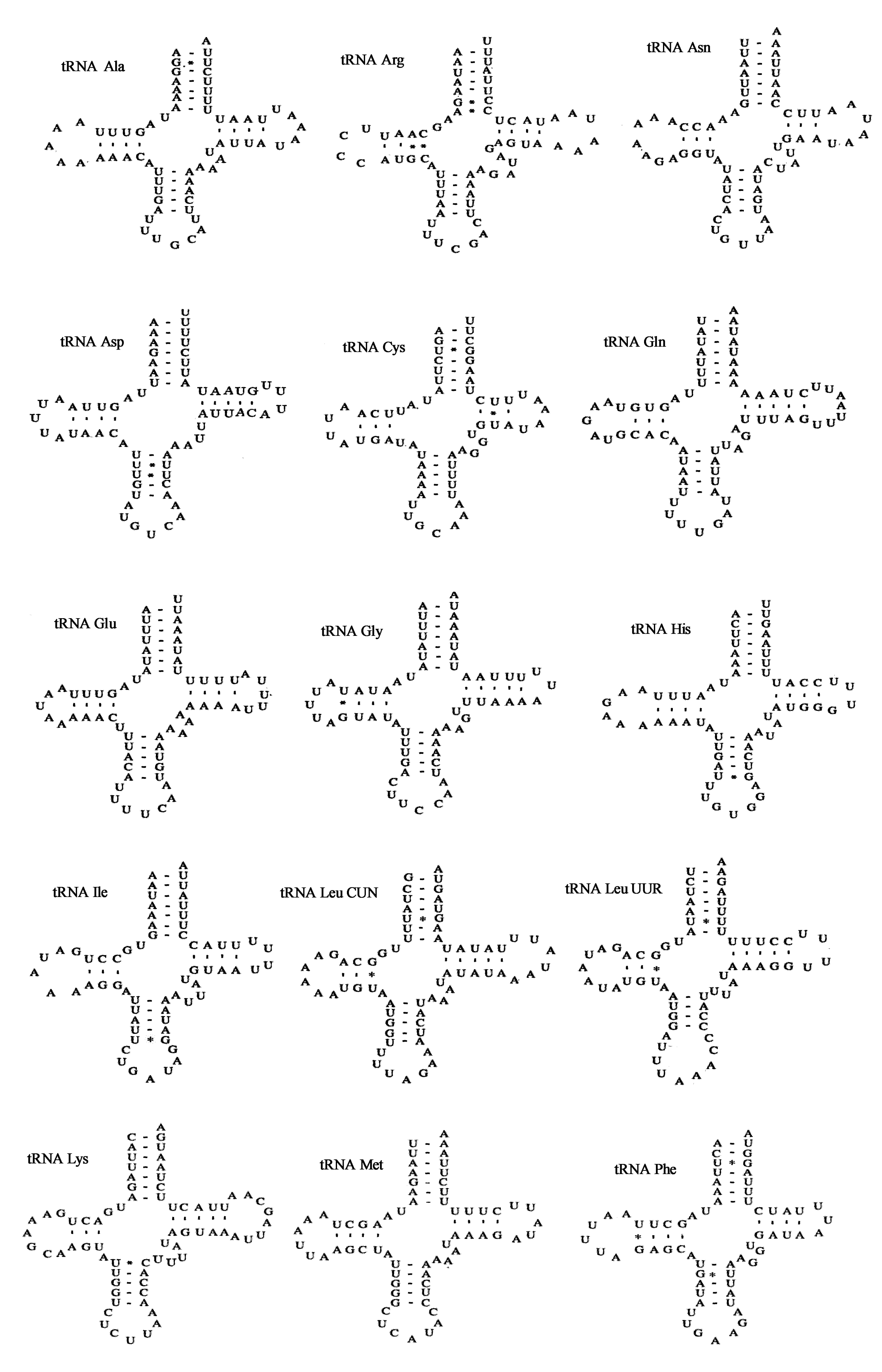


图 2　菜粉蝶 22 个 tRNA 基因二级结构

Fig. 2　Predicated clover-leaf secondary structures for 22 tRNA genes of *Pieris rapae*

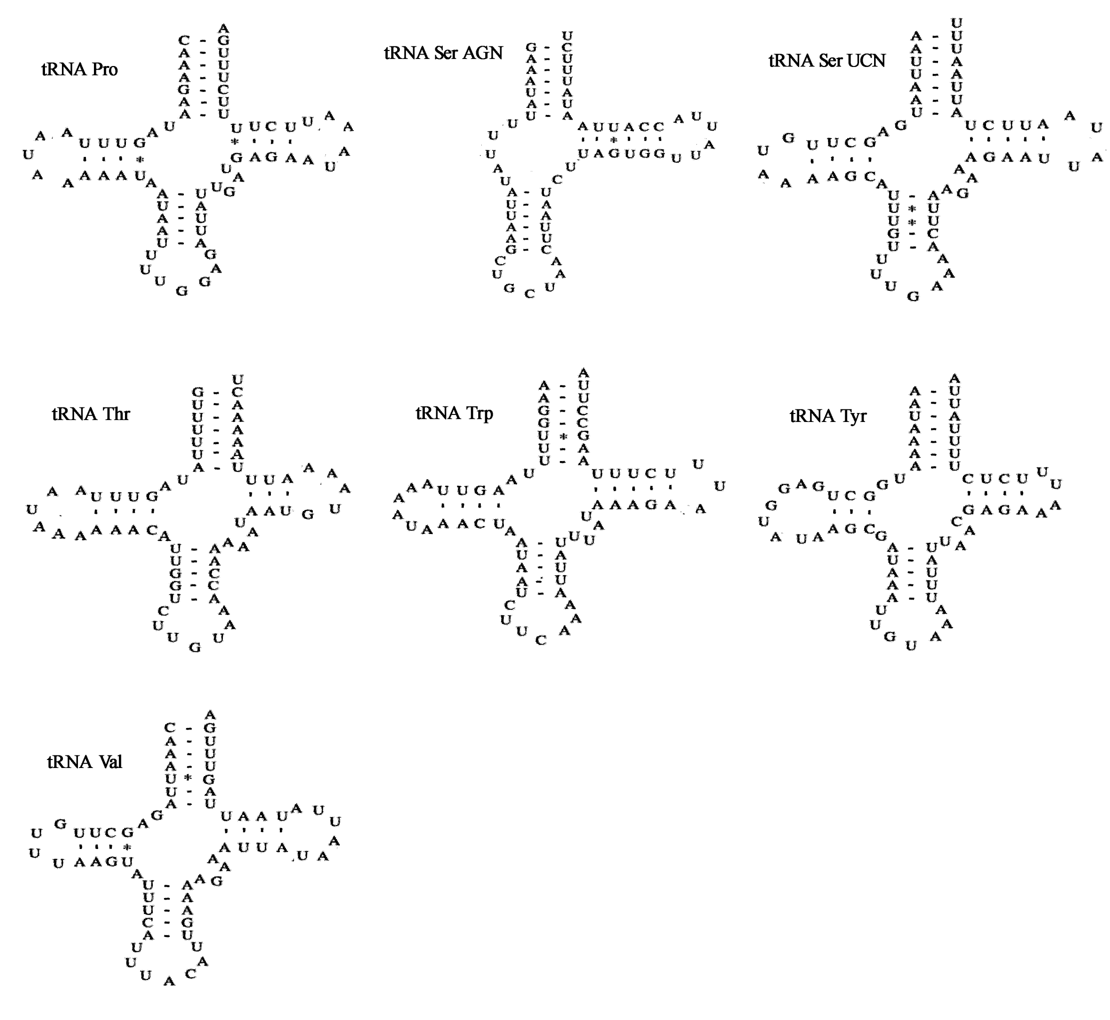


图 2 菜粉蝶 22 个 tRNA 基因二级结构(续)

Fig. 2 Predicated clover-leaf secondary structures for 22 tRNA genes of *Pieris rapae* (continued)

3 对在 TψC 环(假尿嘧啶核苷-胸腺嘧啶核糖核苷环)上, 8 对在反密码环上, 错配的碱基除 $tRNA^{Arg}$ 存在 G・C, A・C, G・A, C・C 错配外, 其他仅为 G・U, U・G 和 U・U 错配。有学者认为基因的部分错配可以通过 RNA 编辑校正, 不会引起氨基酸转运上的障碍(Yokobori and Pääbo, 1995)。

鳞翅目的 sr RNA (12S rRNA) 和 lr RNA (16S rRNA) 基因具有较高的保守性。sr RNA 基因位于 $tRNA^{Val}$ 与 A + T 丰富区之间, lr RNA 基因位于 $tRNA^{Leu}$ 与 $tRNA^{Val}$ 之间。在菜粉蝶 mtDNA 中, 两者的长度分别为 764 bp 和 1 330 bp。

2.3 A + T 富集区

菜粉蝶 A + T 富集区为非编码区, 全长 393 bp, 位于 $tRNA^{Met}$ 和 12S rRNA 基因之间, 这个区域 A 和 T 含量相对较高, 有着高度的遗传变异率, 同时也有少量的重复序列, 是 mtDNA 中长度变化最大的区域(Moritz *et al.*, 1987)。9 种蝶类(中华虎凤蝶和柑桔凤蝶未完全测通, 缺少该序列, 在此未列出) A + T 含量分别为苎麻珍蝶(96.05%) > 斐豹蛱蝶(95.42%) > 朝灰蝶(94.13%) > 大卫绢蛱蝶(96.05%) > 台湾宽尾凤蝶(94.25%) > 红珠绢蝶(93.65%) > 菜粉蝶(91.6%) > 金裳凤蝶(89.74%) > 黑纹粉蝶(89.17%)。

2.4 蛋白编码基因

菜粉蝶线粒体基因组含有 13 个蛋白编码基因, 总长为 11 196 bp。在 13 个蛋白编码基因中, 除了 ND1, ND4, ND4L 和 ND5 这 4 个基因是 L 链(N 链)编码之外, 其余的 9 个基因均由 H 链(J 链)编码。起始密码子除 COI 和 ND1 不同外, ND2, ND3, ND5 和 ATPase8 为 ATT 外, 其余均为 ATG; 终止密码子使用中, ND3 和 ND5 为 TAG, COI 为不完全密码子, 其余均为 TAA。蛋白编码基因没有内含子, 相邻基因之间有重叠现象, 例如: ATPase8 与 ATPase6 重叠 7 bp, ND4 与 ND4L 重叠 6 bp, ND6

和 Cytb 重叠 1 bp。

2.4.1　序列变异：MEGA 4.0 软件分析显示，在 11 种蝴蝶的 13 个蛋白质编码氨基酸序列中，共得到 3 780个同源位点，其中保守位点 2 087 个，变异位点 1 666 个，简约信息位点 1 002 个。氨基酸平均值显示：平均值小于 1 的为 Cys，其中中华虎凤蝶的 Cys 含量最低，仅为 0.77；平均值在 1 ~ 2 之间的为 Asp，Glu，His，Gln 和 Arg；在 2 ~ 5 间的为 Ala，Lys，Val，Pro 和 Trp；平均值在 5 ~ 10 之间的为 Gly，Met，Asn，Ser 和 Tyr；大于 10 的为 Phe，Ile 和 Leu，在 Ile 中，朝灰蝶的量最高，菜粉蝶量最低；在 Phe 中，中华虎凤蝶的量最高，红珠绢蝶的量最低。

2.4.2　系统进化树重建方法：基于 13 个蛋白质编码基因的氨基酸序列，以舞毒蛾 *Lymantria dispar* 为外类群，采用距离法中的 NJ（neighbor-joining）算法和 MP（maximum-parsimony）算法重建系统发生树，其拓扑结构高度一致（图 3）。NJ 树和 MP 树显示结果为：11 种蝴蝶分为 2 大支系，（（（（斐豹蛱蝶，苎麻珍蝶），大卫绢蛱蝶），朝灰蝶），（黑纹粉蝶，菜粉蝶））为一支系，（（（宽尾凤蝶，柑橘凤蝶），（中华虎凤蝶，红珠绢蝶）），金裳凤蝶）为另一支系。

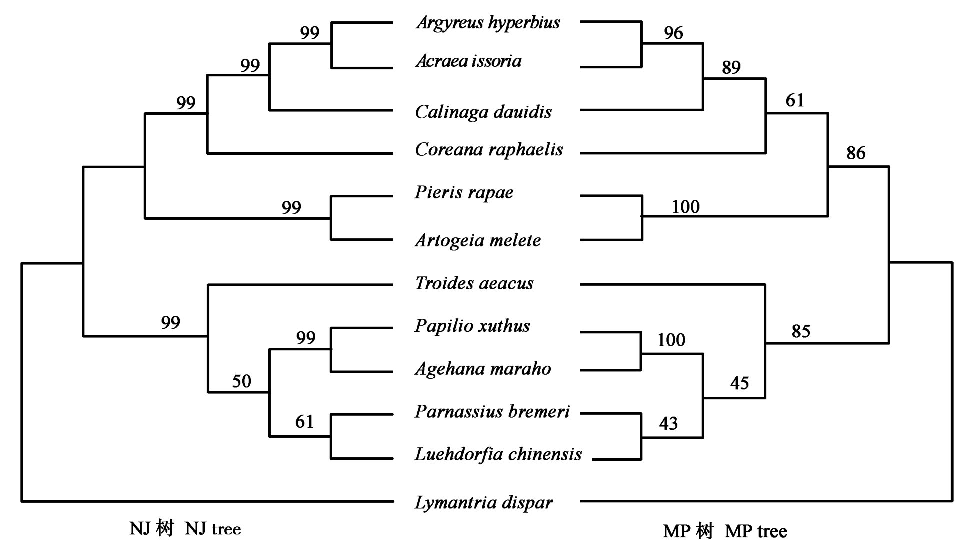


图 3　基于 13 个蛋白质编码基因全序列构建的 NJ、MP 树（各分支上数字为 1 000 次内部分支检验置信值）

Fig. 3　The NJ and MP tree based on the complete 13 protein coding gene sequence data (numbers on each node correspond to their bootstrap values for 1 000 replicates)

3　讨论

菜粉蝶线粒体基因组全序列长度为 15 157 bp。通过分析发现，基因组的基因组成及排列顺序与大多数蝶类相同（Kim *et al.*，2006），其线粒体基因组中 A + T 富集区位于 $tRNA^{Met}$ 和 12S rRNA 基因之间。这些都表明了蝶类线粒体基因组进化上的保守性。然而，菜粉蝶与其他蝶类线粒体基因组相比也存在一些差异，例如，$tRNA^{Arg}$ 上出现的错配较多。上述 9 种蝶类 mtNDA 序列碱基 A + T 含量均大于 G + C，而菜粉蝶碱基 A 含量较高，为 40.41%。另外菜粉蝶的 12S 和 16S rRNA 的长度与鳞翅目其他物种的核糖体基因的长度相似（Clary and Wolstenholme，1983；Beard *et al.*，1993；Mitchell *et al.*，1993；Spanos *et al.*，2000；Wilson *et al.*，2000；Kim *et al.*，2006；Hu *et al.*，2009）。

菜粉蝶的 $tRNA^{Ser(AGN)}$ 缺少二氢尿嘧啶环（DHU loop），这在后生动物中较为普遍。但是也有例外，卷蛾科茶小卷叶蛾 *Adoxophyes honmai*（Lee *et al.*，2006）和长角羽虱科一种虱子 *Bothriometopus* sp.（Cameron *et al.*，2007）的所有 tRNA 都具有典型的三叶草结构。位于 $tRNA^{Gln}$ 基因与 ND2 基因之间的间隔区，在已报道的所有的鳞翅目昆虫的线粒体基因组中都存在，此间隔区 A + T 含量相对较高，9 种蝶类在此间隔区分别为：金裳凤蝶 94.74% > 朝灰蝶 94.64% > 黑纹粉蝶 93.75% > 大卫绢蛱蝶 89.13% = 菜粉蝶 89.13% > 斐豹蛱蝶 88.46% > 苎麻珍蝶 88.24% > 红珠绢蝶 77.5% > 台湾宽尾凤蝶 76.6%。此区的位置在所有鳞翅目昆虫中是固定不

变的，只是序列的变异性较大，甚至在同属的亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 与玉米螟 *Ostrinia nubilalis*，家蚕 *Bombyx mori* 与野（桑）蚕 *Bombyx mandarina* 中序列变异性也很大。但是，该间隔区在其他昆虫的线粒体基因组中却不存在（Beckenbach *et al*., 1993；Taanman, 1999；Cameron and Whiting, 2007），故此区可以看做鳞翅目昆虫的线粒体基因组的分子标记（Junqueira *et al*., 2004；Cha *et al*., 2007）。

在菜粉蝶线粒体基因组中，除 COI 外，其余 12 个蛋白质编码基因都使用标准的 ATN 起始密码子；在菜粉蝶线粒体基因组中（表 2），ND2，ND3，ND5，ND6 和 ATP8 的起始密码子皆为 ATT，COII，ATP6，COIII，ND4，ND4L 和 Cytb 的起始密码子为 ATG，ND1 的起始密码子为 ATA。通常情况下，在昆虫中物种 COI 基因没有标准的起始密码子，Kim 等(2006)认为，朝灰蝶 COI 基因的起始密码子为四核苷酸 TTAG；Clary 和 Wolstenholme（1983）以及 De Bruijn 等(1983)认为 COI 基因的起始密码子为四核苷酸 ATAA 或 ATTA；也有人认为 COI 基因的起始密码子为六核苷酸，如玉米螟 *O. nubilalis* 和亚洲玉米螟 *O. furnacalis* 中 COI 基因的起始密码子为 TATTAG（Coates *et al*., 2005），家蚕 *B. mori* 为 TTTTAG，冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*（Beard *et al*., 1993）、四斑按蚊 *Anopheles quadrimaculatus*（Mitchell *et al*., 1993）和地中海实蝇 *Ceratitis capitata*（Spanos *et al*., 2000）为 ATTTAA。在无脊椎动物和一些昆虫线粒体基因组中，如窗萤 *Pyrocoelia rufa*（Bae *et al*., 2004）COI 基因的起始密码子为 TTG，而菜粉蝶却与以上皆不同，为 TTAAAG 六联体密码子。在菜粉蝶 13 个蛋白质编码基因中，除 COI，ND3 和 ND5 基因外，其余 10 个蛋白质编码基因都以 TAA 密码子结尾；COI 基因以单个 T 残基结尾，ND3 和 ND5 基因以 TAG 结尾。不完全的终止密码子可能通过 mRNA 加工过程中的多聚腺苷酸化形成完整的终止密码子（Ojala *et al*., 1980；Anderson *et al*., 1981；Lu *et al*., 2002）。

本文基于线粒体全序列中蛋白质编码基因区探讨了 11 种蝶类的系统发生关系，表明绢蝶类与凤蝶类亲缘关系较近；粉蝶类与蛱蝶类、珍蝶类和灰蝶类有较近的亲缘关系。本文的结果不支持粉蝶科与凤蝶科(包括凤蝶类和绢蝶类)构成单系群，却显示粉蝶科、灰蝶科和蛱蝶科的组合为单系群。Wahlberg 等（2005）用 2 个核基因（ *EF-1α* 和 *wingless*）、1 个线粒体基因（*COI*）分析的结果将各科间的系统发生关系表示为：（弄蝶科 +（凤蝶科 +（粉蝶科 +（蛱蝶科 +（蚬蝶科 + 灰蝶科)))))。本文的结果支持 Wahlberg 等人上述的结论，但与邹方振等(2009)基于线粒体 *ND*1 和 16*S rRNA* 基因组合序列数据的分析结果，即凤蝶类和粉蝶类亲缘关系较蛱蝶类为近的结论相悖。因而凤蝶类、粉蝶类、蛱蝶类 3 大类群之间的系统发生关系需在后期研究中进一步予以佐证。

参 考 文 献（References）

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806): 457 – 465.

Arsene C, Schulz S, Van Loon JJA, 2002. Chemical polymorphism of the cuticular lipids of the cabbage white *Pieris rapae*. *Journal of Chemical Ecology*, 28: 2627 – 2631.

Bae JS, Kim I, Sohn HD, Jin BR, 2004. The mitochondrial genome of the firefly, *Pyrocoelia rufa*: complete DNA sequence, genome organization, and phylogenetic analysis with other insects. *Mol. Phylogenet. Evol*., 32: 978 – 985.

Beard CB, Hamm DM, Colllins FH, 1993. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with the mitochondrial sequences of other insect. *Insect Mol. Biol*., 2: 103 – 124.

Beckenbach AT, Wei YW, Liu H, 1993. Relationships in the *Drosophila obscura* species group, inferred from mitochondrial cytochrome oxidase II sequences. *Mol. Biol. Evol*., 10(3): 619 – 634.

Bridge D, Cunningham CW, Schierwater B, DeSalle R, Buss LW, 1992. Class-level relationships in the phylum Cnidaria: evidecnce from mitochondrial genome structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 8750 – 8753.

Cameron SL, Johnson KP, Whiting MF, 2007. The mitochondrial genome of the screamer louse *Bothriometopus* (Phthiraptera: Ischnocera): effects of extensive gene rearrangements on the evolution of the genome as a whole. *J. Mol. Evol*., 65: 589 – 604.

Cameron SL, Whiting MF, 2007. Mitochondrial genomic comparisons of the subterranean termites from the genus *Reticulitermes* (Insecta: Isoptera: Rhinotermitidae). *Genome*, 50: 188 – 202.

Cha SY, Yoon HJ, Lee EM, Yoon MH, Hwang JS, Jin BR, Han YS, Kim I, 2007. The complete nucleotide sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the bumblebee, *Bombus ignites* (Hymenoptera: Apidae). *Gene*, 392: 206 – 220.

Clary DO, Wolstenholme DR, 1983. Genes for cytochrome c oxidase subunit I, URF2 and three tRNAs in *Drosophila* mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res*., 11: 6859 – 6872.

Coates BS, Sumerford DV, Hellmich RL, Lewis LC, 2005. Partial mitochondrial genome sequences of *Ostrinia nubilalis* and *Ostrinia furnicalis*. *Int. J. Biol. Sci*., 1: 13 – 18.

De Bruijn MHL, 1983. *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA, a novel organization and genetic code. *Nature*, 304: 234 - 241.

Feng X, Liu DF, Wang NX, Zhu CD, Jiang GF, 2010. The mitochondrial genome of the butterfly *Papilio xuthus* (Lepidoptera: Papilionidae) and related phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Rep.*, DOI 10.1007/s11033-010-0044-z.

Guo XX, Zheng ZM, 2002. Studies on esterase isoenzyme of *Pieris rapae* at different developmental stages. *Acta Entomologica Sinica*, 45(3): 401 - 403. [郭晓霞, 郑哲民, 2002. 菜粉蝶不同发育期酯酶同工酶的比较研究. 昆虫学报, 45(3): 401 - 403]

Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN, 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(4): 968 - 971.

Hooks CR, Pandy R, Jonson MW, 2007. Evaluating spiders for their potential to control cabbage white butterflies (*Pieris rapae*). *Insect Pests*, IP25: 1 - 4.

Hou TD, He FY, Cheng F, 2005. Electrical response of lamina ganglion in *Vanssa cardui* and *Pieris rapae* to light stimulation on compound eye. *Journal of Lanzhou University*, 41(3): 45 - 47. [侯天德, 何福元, 程昉, 2005. 光刺激蛱蝶和菜粉蝶复眼引起的视神经节层电生理反应. 兰州大学学报, 41(3): 45 - 47]

Hu J, Zhang DX, Hao JS, Huang DY, Cameron S, Zhu CD, 2009. The complete mitochondrial genome of the yellow coaster, *Acraea issoria* (Lepidoptera: Nymphalidae: Heliconiinae: Acraeini) sequence, gene organization and a unique tRNA translocation event. *Mol. Biol. Rep.*, DOI 10.1007/s11033-009-9934-3.

Jõgar K, Metspalu L, Hiiesaar K, Ploomi A, Svilponis E, Kuusik A, Men′shykova N, Kivimägi I, Luik A, 2009. Influence of white cabbage cultivars on oviposition preference of the *Pieris rapae* L. (Lepidoptera: Pieridae). *Agronomy Research*, 7: 283 - 288.

Junqueira ACM, Lessinger AC, Torres TT, Da Silva FR, Vettore AL, Arruda P, Azeredo-Espin AML, 2004. The mitochondrial genome of the blowfly *Chrysomya chloropyga* (Diptera: Calliphoridae). *Gene*, 339: 7 - 15.

Kim HR, Ko YG, Mayer RT, 1988. Purification, characterization, and synthesis of vitellin from the cabbage butterfly, *Pieris rapae* L. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 9: 67 - 79.

Kim I, Lee EM, Seol KY, Yun EY, Lee YB, Hwang JS, Jin BR, 2006. The mitochondrial genome of the Korean hairstreak, *Coreana raphaelis* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Insect Mol. Biol.*, 15: 217 - 225.

Lee ES, Shin KS, Kim MS, Park H, Cho S, Kim CB, 2006. The mitochondrial genome of the smaller tea tortix *Adoxophyes honmai* (Lepidoptera: Tortricidae). *Gene*, 373: 52 - 57.

Li YR, 2006. Agricultural Entomology. Higher Education Press, Beijing. 151 - 152. [李云瑞, 2006. 农业昆虫学. 北京: 高等教育出版社. 151 - 152]

Liu XY, Wu XB, Zhu LX, 2007. Phylogenetic relationship of six genera of the Coliadinae (Lepidoptera: Pieridae) in China based on partial sequences of EF-lα and COII genes. *Acta Entomologica Sinica*, 50(6): 604 - 609. [刘晓燕, 吴孝兵, 诸立新, 2007. 中国黄粉蝶亚科六属间基于 COII 和 EF-1α 基因部分序列的系统发育关系(鳞翅目: 粉蝶科). 昆虫学报, 50(6): 604 - 609]

Lu C, Liu YQ, Liao SY, Li B, Xiang ZH, Han H, Wang XG, 2002. Complete sequence determination and analysis of *Bombyx mori* mitochondrial genome. *J. Agric. Biotechnol.*, 10: 163 - 170.

Mahendran B, Ghosh SK, Kundu SC, 2006. Molecular phylogeny of silk-producing insects based on 16S ribosomal RNA and cytochrome oxidase subunit I genes. *J. Genet.*, 85(1): 31 - 38.

Mitchell S, Cockburn A, Seawright J, 1993. The mitochondrial genome of *Anopheles quadrimaculatus* species A: complete nucleotide sequence and gene organization. *Genome*, 36: 1058 - 1073.

Moritz C, Dowling TE, Brown WM, 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 269 - 292.

Ojala D, Merkel C, Gelfand R, Attardi G, 1980. The tRNA genes punctuate the reading of genetic information in human mitochondrial DNA. *Cell*, 22: 393 - 403.

Shi HW, Ding FM, Huang Y, 2008. Complete sequencing and snalysis of mtDNA in *Phlaeoba albonema* Zheng. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 24(7): 604 - 611.

Simon C, Frati F, Bekenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain-reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87: 651 - 701.

Sobti RC, Sharma VL, Kumari M, Gill TK, Singh J, Sodhi M, Mukesh M, Bansal, S, Arya S, Bisnoi S, 2007. Genetic relatedness of six North-Indian butterfly species based on 16S rRNA sequence analysis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 295: 145 - 151.

Spanos L, Koutroumbras G, Kotsyfakis M, Louis C, 2000. The mitochondrial genome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Insect Mol. Biol.*, 9(2): 139 - 144.

Stoneking M, Soodyall H, 1996. Human evolution and the mitochondrial genome. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 6(6): 731 - 736.

Taanman JW, 1999. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim. Biophys. Acta*, 1410: 103 - 123.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG, 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25(24): 4876 - 4882.

Vigilan L, Stoneking M, Harpending H, Hawkes K, Wilson AC, 1991. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science*, 253: 1503 - 1507.

Wahlberg N, Brower AVZ, Nylin S, 2005. Phylogenetic relationships and historical biogeography of tribes and genera in the subfamily Nymphalinae (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biol. J. Linn. Soc.*, 86: 227 - 251.

Wang JY, Huang KW, 2001. Studies on the ribosomal RNA gene (rDNA) of a microsporidium isolated from *Pieris rapae* L. *Acta Microbiologica Sinica*, 41(5): 598 - 604. [王见杨, 黄可威, 2001. 菜粉蝶微孢子虫核糖体 RNA (rRNA)编码基因的研究. 微生物学报, 41(5): 598 - 604]

Wilson K, Cahill V, Ballment E, Benzie J, 2000. The complete

sequence of the mitochondrial genome of the crustacean *Penaeus monodon*: are malacostracan crustaceans more closely related to insects than to branchiopods. *Mol. Biol. Evol.*, 17(6): 863 - 874.

Xu L, Hao JS, Zhu GP, Yin XB, Pan HC, Huang DY, Zhang XP, 2007. Molecular phylogenetic relationships of some species and genera in Pierinae and Coliadnae (Pieridae) based on partial sequence of mitochondrial COI and Cytb genes. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 32(4): 842 - 850. [许丽, 郝家胜, 朱国萍, 殷先兵, 潘鸿春, 黄敦元, 张小平, 2007. 基于线粒体 COI 和 Cytb 基因的粉蝶亚科及黄粉蝶亚科(粉蝶科)部分类群的分子系统发生. 动物分类学报, 32(4): 842 - 850]

Yokobori S, Pääbo S, 1995. Transfer RNA editing in land snail mitochondrial. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(22): 10432 - 10435.

Zhai XL, Yang X, 2008. Study on fatality of extract concentration of *Melia azedarach* L. against cabbage caterpillar and diamondback moth. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 7: 70 - 71. [翟兴礼, 杨霞, 2008. 苦楝果实甲醇提取液对菜青虫、小菜蛾致死活性研究. 河南农业科学, 7: 70 - 71]

Zhang DX, Hao JS, Zou FZ, Zhu GP, Pan HC, Zhang XP, 2009. Phylogenetic relationships among the ten genera in the subfamily Argynninae (Lepidoptera, Nymphalidae) based on mitochondrial Cytb and CO Ⅰ gene sequences. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 34(3): 522 - 530. [张大秀, 郝家胜, 邹方振, 朱国萍, 潘鸿春, 张小平, 2009. 基于线粒体 Cytb 基因和 COI 基因序列研究豹蛱蝶亚科(鳞翅目, 蛱蝶科)10 属间的系统发生关系. 动物分类学报, 34(3): 522 - 530]

Zou FZ, Hao JS, Huang DY, Zhang DX, Zhu GP, Zhu CD, 2009. Molecular Phylogeny of 12 families of the Chinese butterflies based on mitochondrial ND1 and 16S rRNA gene sequences (Lepidoptera: Ditrysia: Rhopalocera). *Acta Entomologica Sinica*, 52(2): 191 - 201. [邹方振, 郝家胜, 黄敦元, 张大秀, 朱国萍, 朱朝东, 2009. 基于线粒体 ND1 和 16S rRNA 基因序列探讨中国蝴蝶 12 科的系统发育关系(鳞翅目: 双孔次亚目: 蝶类). 昆虫学报, 52(2): 191 - 201]

(责任编辑: 袁德成)